

この説明書をよく読んでから使用してください。
本製品は、研究用試薬です。診断目的には使用しないでください。

研究用

2011 年 3 月作成（第 1 版）



百日咳菌検出試薬キット

Bordetella pertussis Detection Kit

【特徴】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 1 種類の酵素のみを使用して遺伝子増幅反応が等温で進行する^{1), 2)}、② 6 領域を認識する 4 種類のプライマーを使用するため特異性が高い、③ 増幅効率が高く、短時間に増幅可能である、④ 増幅産物量が多く、簡易検出に適している^{3), 4)}、等の特徴を有する遺伝子増幅法です。

本製品は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の遺伝子を検出する⁵⁾ 試薬です。検査対象の検体から DNA 抽出した溶液をサンプル溶液とします。このサンプル溶液と 2×Reaction Mix. (RM)、Primer Mix. BP (PM BP)、Distilled Water (DW)、*Bst* DNA Polymerase を混合してインキュベートすると、プライマーで認識される百日咳毒素プロモーター遺伝子が存在した場合に、*Bst* DNA Polymerase の働きでサンプル溶液中の DNA から増幅反応が進行します。核酸増幅の検出は、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウム (白色沈殿物質) の濁度の変化によって行い、百日咳菌の有無を判定します。

反応原理の詳細については、Eiken GENOME SITE (URL ; <http://loopamp.eiken.co.jp/>) を参照してください。

【内容】

48 テスト分

- | | |
|--|----------------|
| (1) 2×Reaction Mix. (RM)※1 | 0.6 mL×1 tube |
| (2) Primer Mix. BP (PM BP)※1 | 0.12 mL×1 tube |
| (3) <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase)※1 | 60 μL×1 tube |
| (4) Distilled Water (DW)※1 | 1.0 mL×1 tube |
| (5) Positive Control BP (PC BP)※1 | 0.1 mL×1 tube |

※1 : () 内の表示は、試薬チューブに記載されている表示です。

【使用方法】

1. 必要な器具・装置・試薬

- (本製品には含まれていませんので別途用意してください。)
- 滅菌済レーヨン製綿棒 (栄研化学 ャコレクトスワブ R II など)
- DNA 抽出用試薬 (QIAamp DNA Micro Kit, QIAGEN 社)
 - マイクロ遠心機 (2mL ローター付、20,000×g)
 - 抽出液回収用核酸低吸着チューブ (1.5mL)
 - エタノール (96~100%)
- マスターミックス調製用滅菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL)
- ピペット (0.5~10 μL, 10~100 μL, 100~1,000 μL)
- フィルター付きピペットチップ (RNase, DNase フリー)
- ヒートブロック (加熱変性用)
- 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 氷 (クラッシュアイス) 及びアイスボックス
- 微量簡易遠心機
- 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
- ボルテックスミキサー
- Loopamp 反応チューブ (栄研化学株式会社別売品)
- リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用)

2. サンプル溶液の調製

- 1) 後鼻腔などから滅菌済レーヨン製綿棒 (栄研化学 ャコレクトスワブ R II など) を用いて検体 (鼻咽頭分泌液) を採取します。
- 2) DNA 抽出操作
市販の DNA 抽出試薬を用いて抽出サンプル溶液を調製してください。尚、DNA 抽出用試薬 (QIAamp DNA Micro Kit, QIAGEN 社) の使用を推奨いたします。
- 3) 抽出したサンプル溶液は、測定前にヒートブロックを用いて 95℃、5 分間加熱後、氷上で急冷しそのまま 5 分間以上静置したものを使用してください。

3. 試薬の調製

- 1) -20℃で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。
- 2) マスターミックスの調製 (氷上で行ってください。)
別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに 2×Reaction Mix. (RM)、Primer Mix. BP (PM BP)、*Bst* DNA Polymerase 及び Distilled Water (DW) を、次表の割合で分注します。

<試薬>	<用量: 1test>	<用量: 10tests>
2×Reaction Mix. (RM)	12.5 μL	125 μL
Primer Mix. BP (PM BP)	2.5 μL	25 μL
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0 μL	10 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL	40 μL
合 計	20.0 μL	200 μL

☆ 調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

4. 操作方法

- 1) マスターミックスとサンプル溶液の混合 (氷上で行ってください。)
(1) Loopamp 反応チューブにマスターミックス 20 μL を分注します。
(2) サンプル溶液 5 μL を添加し全量 25 μL とします。このとき、ピペッティング又はキャップを開めた上でのタッピングで良く混合した後、8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドアウンします。
(3) コントロール反応用として、サンプル溶液の代わりに陽性コントロールには Positive Control BP (PC BP) を、陰性コントロールには Distilled Water (DW) 5 μL を用います。
☆ 混合の際には気泡が立たないように注意してください。
☆ 反応チューブにサンプル溶液が添加されていることを目視で確認してください。

2) リアルタイム濁度検出による増幅反応及び判定

- (1) リアルタイム濁度測定装置 (LAMP 法専用) を使用する前までに立ち上げて、測定条件を本製品用に合わせます。
設定は次のとおりです。
〔温度〕: 反応ブロック: 65℃、ホットボンネット: 75℃
〔測定時間〕: 40 分
〔酵素失活処理〕: 80℃, 5 分間
- (2) 表示温度が 65℃に達していることを確認します。
- (3) 調製、分注済みの反応チューブをセットして測定を開始します。
- (4) 装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の変化を確認します。陽性コントロール; Positive Control BP (PC BP) で濁度が上昇し、陰性コントロール; Distilled Water (DW) で濁度が上昇していなければ、LAMP 反応は正常に進行しています (下図参照)。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施してください。
- (5) 各検体の判定を行います。増幅反応時間内 (40 分間) に Positive Control BP と同様に濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇が認められない場合を「陰性」と判定します。
- (6) 検体によって濁度上昇開始時間や濁度上昇値が陽性コントロール; Positive Control BP (PC BP) と異なる場合があります。
- (7) 酵素失活処理 (80℃, 5 分間) (リアルタイム濁度測定装置では設定により自動処理されます。) が終了していることを確認した後、装置から使用済み反応チューブを取り出して、そのままキャップを開けずに廃棄してください。

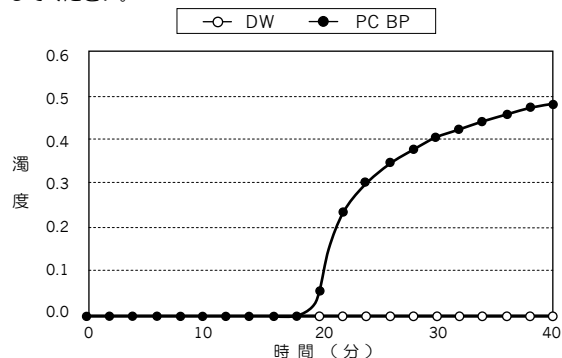
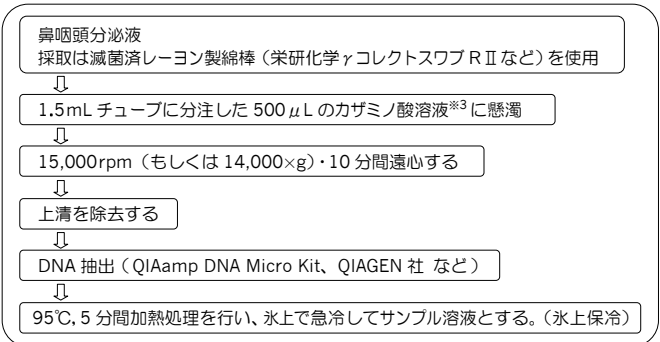


図. Positive Control BP (PC BP) の増幅曲線パターン※2

※2: 本試薬の濁度立ち上がり時間と初期鑄型量の間に相関はありません。

■キット使用操作手順

＜検体の前処理：採取とサンプル溶液の調製＞



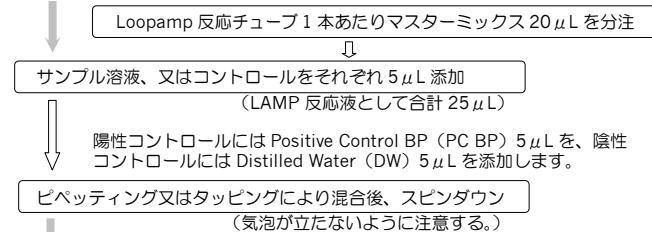
＜マスターミックスの調製＞（氷上操作）

必要検体数分量（陽性、陰性コントロールも含む）を調製

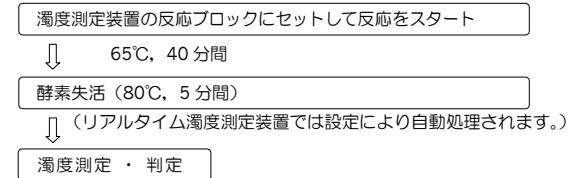
マスターミックスの調製（1 テストの分量）	
2×Reaction Mix. (RM)	12.5 μL
Primer Mix. BP (PM BP)	2.5 μL
Bst DNA Polymerase	1.0 μL
Distilled Water (DW)	4.0 μL
合 計	20.0 μL

よく混合し※4、スピンドアウン後、マスターミックスとする。（氷上保冷）

＜操作方法＞（氷上操作）



＜LAMP 反応＞



※3：1% Bacto casamino acids, 0.6% NaCl, pH 7.1（オートクレーブ滅菌）。
菌の培養を伴わない場合は生理食塩水でも代用できます。

※4：タッピングか、又は転倒混和、あるいはボルテックスミキサー1 秒間×3 回。

【性能】

検出限界；20 copies/test※5

※5：百日咳菌の標的遺伝子領域を挿入したプラスミド DNA を検体として測定した場合。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 一般的な注意

- 1) LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、鋳型 DNA や増幅産物が極微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となるおそれがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、可能な限りサンプルの調製と試薬の調製は、別々のクリーンベンチ等を使用して行ってください。
- 2) DNA 分解酵素 (DNase) の混入を避けてください。DNA は DNase により容易に分解されます。DNase は材料である検体や組織等、実験器具、試薬、水、更には実験者自身の唾液や汗からも混入するおそれがあります。
- 3) 検体は感染の危険があるものとして、その検体採取・取扱いについては必要なバイオハザード対策⁶⁾を取ってください。
- 4) 本製品は、学術研究目的のみにご使用ください。
- 5) 本製品の使用にあたっては遺伝子の知識、経験を有した技術者の指導のもとで実施してください。
- 6) 本製品の性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った結果、判定、またはその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。
- 7) リアルタイム濁度測定装置を使用する場合、添付文書や使用説明書、取扱説明書等をよく読んでから使用してください。

2. 試薬の取扱い

- 1) 本製品は必ず-20℃で保存し、試薬の劣化を防止するために、使用時には必要な試薬だけを箱から取り出してご使用ください。（凍結融解を 20 回繰り返した結果では、試薬の劣化は認められておりませんが、無用な凍結融解は品質維持のために避けてください。）
- 2) 試薬の解凍は室温で行い、調製と保存は氷上で行ってください。試薬を使用する際には、一旦スピンドアウンしてチューブの管壁やキャップに付着している試薬を落とした後、十分混合し再度スピンドアウンしてからご使用ください。尚、失活するおそれがありますので、Bst DNA Polymerase は激しく撹拌しないでください。
- 3) 反応チューブは必ず専用の Loopamp 反応チューブをご使用ください。指定以外の反応チューブを使用した場合、光透過性の違いにより誤判定を招く可能性があります。
- 4) 反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。
- 5) 反応チューブは使用する前に、キズ・ヒビ等がないことを目視で確認してください。反応チューブにヒビ・キズ等があると正しく測定できないばかりか、チューブの破損により装置を汚染する可能性があります。リアルタイム濁度測定装置のブロック内でチューブが破損した場合は、反応液が装置本体に漏出し、除去不能な汚染や故障の原因となります。
- 6) 反応チューブにマスターミックス、サンプル溶液が添加されていることを、他のチューブとの液量比較で確認してください。
- 7) コンタミネーションを避けるため、開封後の反応チューブは陽性コントロール及び陽性が否定されていない検体とは離れた場所で保管してください。
- 8) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 9) 試薬が余った場合、たとえ同一ロットであっても他キットへの使用はしないでください。

3. 操作方法の留意点

- 1) 検体を採取する綿棒は滅菌済レーヨン製綿棒（栄研化学γコレクトスワブ R II など）をお使いください。
- 2) サンプル溶液（DNA 抽出液）は原則として直ちに測定してください。また、長期に保存する場合は-80℃以下に保存し凍結融解の繰り返しは避けてください。
- 3) サンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度判定の支障となり誤判定の原因となります。気泡が生じないように注意してください。気泡が生じてしまった場合は、スピンドアウンを行う等気泡を取り除いてください。
- 4) リアルタイム濁度測定装置は測定時高温となっております。火傷等に十分注意してください。
- 5) 反応後のチューブを装置から取り出すときにチューブの蓋が開かないよう、慎重に取り出してください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となるばかりでなく、測定環境そのものを汚染し、汚染を完全に除去しない限り、以後正しい結果が得られなくなる可能性があります。

4. 廃棄上の注意

- 1) 反応後のチューブは蓋を開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。
- 2) チューブはポリプロピレン (PP)、チューブ蓋はポリエチレン (PE)、ケースは紙を主な材質としています。
- 3) 使用後の試薬や容器及び器具類は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

【包装単位・貯蔵方法・有効期間・製品コード】

製 品 名	包装単位	貯蔵方法	有効期間	製品コード
百日咳菌検出試薬キット	48 テスト分	-20℃	1 年間	LMP541

【参考文献】

- 1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research **28**, No.12, e63 (2000)
- 2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem. **47**, No.9, 1742-1743 (2001)
- 3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150-154 (2001)
- 4) Tomita N., et al.: Nat Protoc. **3**, No.5, 877-882 (2008)
- 5) Kamachi K., et al.: J. Clin. Microbiol. **44**, No.5, 1899-1902 (2006)
- 6) 国立感染症研究所：国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (2007)

【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口

フリーダイヤル ☎ 0120-308-421

製造販売元



栄研化学株式会社

栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地